

## Lactobacillus におけるカドミウム耐性機構の解析

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 金政泰弘教授)

片 山 靖 夫

(平成元年2月21日受稿)

Key words : Cadmium, *Lactobacillus*, Resistance, Detoxication

### 緒 言

カドミウムは生体に対して強力な毒性を有する重金属の一種であり、生活環境や食品等に対する汚染が社会問題となる事も多い<sup>1)</sup>。したがって、各種生物に対するカドミウムの毒性およびこれら生物におけるカドミウム毒性の軽減機構の研究も多くなされている。

多くの高等動物および酵母では、アミノ酸配列の非常に良く類似したカドミウム結合蛋白質の存在が知られており、摂取されたカドミウムが本蛋白質と結合する事により、毒性が弱められると考えられている<sup>2),3),4)</sup>。しかし細菌でのカドミウムの毒作用およびカドミウム毒性の軽減機構の研究は余り多くなく、グラム陽性菌、特に黄色ブドウ球菌におけるプラスミド上遺伝子に支配されたカドミウム耐性機構の研究と<sup>5),6)</sup>、一部のグラム陰性菌における外膜不透過性によるカドミウム非感受性機構の研究が知られている<sup>7)</sup>。近年、細菌においても高等動物と同様のカドミウム結合蛋白質の存在を示す成績がHighamら<sup>8)</sup>や我々<sup>9)</sup>によって得られている。

*Lactobacillus* は、各種乳製品の生産菌および腸管内細菌叢の構成菌として、我々の生活に密接な関わりを有しており、ヒトの健康維持に貢献していると考えられている。この *Lactobacillus* に対するカドミウムの影響を調べることは、近年特に問題となっている食品等を経由してヒトに摂取される重金属の動態を知る上で重要である。

本論文では、食品等よりヒトに摂取される頻度の高い *Lactobacillus* 4種の増殖に対するカド

ミウムの影響を調べるとともに、カドミウムの *Lactobacillus* における蓄積およびカドミウム耐性機構に関する検討を試みた。その結果、*Lactobacillus* には明確なカドミウム耐性を示す菌群が存在し、これら耐性菌は種レベルで異なった少なくとも2種類のカドミウム耐性機構を有することが明らかとなった。

### 材料と方法

#### 菌株及び培地

供試菌としては Table 1 に示した教室保存の *Lactobacillus plantarum* 3株、*L. fermentum* 3株、*L. acidophilus* 3株を用いた。対照としては重金属耐性についてよく研究されており、カドミウム感受性の明確な *Staphylococcus aureus* 209P FDA を用いた。

菌の培養には1%グルコース加 ISL 液体培地を主として使用した。培養は37℃静置条件にて行った。供試菌株のカドミウムに対する最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) の測定は、上記培地に1.5%寒天を加え、0.1—3 mM の塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2$ ) を添加して作成した固形培地に、1%グルコース加 ISL 液体培地にて前培養した各菌株培養液を、各々マルチプランター (佐久間社製) で菌液 5  $\mu\text{l}$  ( $10^6$  cells) 接種して行った。培養は37℃、24時間行い、カドミウム含有培地上での菌苔の形成の有無により菌の増殖を判定した。増殖の認められなかった菌株はさらに24時間培養を延長し、増殖しないことを確認した。なお、4 mM 以上のカドミウムの添加培地での実験は、著しい沈澱を生じるため行えなかった。

Table 1 Bacterial strains.

Strain #	Strains
101 (Lp)	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014
111 (Lp)	<i>L. plantarum</i> 8-2
112 (Lp)	<i>L. plantarum</i> 9-2
201 (Lc)	<i>L. casei</i> ATCC 7469
210 (Lc)	<i>L. casei</i> ATCC 393
250 (Lc)	<i>L. casei</i> L-14
255 (Lc)	<i>L. casei</i> 34143
256 (Lc)	<i>L. casei</i> N-25
257 (Lc)	<i>L. casei</i> S3-1
260 (Lc)	<i>L. casei</i> ATCC 27216
301 (Lf)	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338
320 (Lf)	<i>L. fermentum</i> YIT 0186
323 (Lf)	<i>L. fermentum</i> YIT 0189
701 (La)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 11506
711 (La)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
721 (La)	<i>L. acidophilus</i> LKT 11
	<i>S. aureus</i> 209P FDA

Abbreviations: Lp, *L. plantarum*; Lc, *L. casei*; Lf, *L. fermentum*; La, *L. acidophilus*.

#### カドミウム量の測定法

各菌株における菌体内カドミウム量は、カドミウム無添加液体培地での前培養菌を、全供試菌株が生育可能な濃度である0.1mMカドミウム含有液体培地10mlに1/100容接種し、37℃、24時間静置培養後の集菌洗浄菌体の含有するカドミウム量をもってあてた。各培養菌は5,000xg、20分間の遠心分離により集菌した。遠心上清の培養液および菌体を蒸留水5mlにて2回遠心洗浄した菌体洗浄液は全て回収し、培地画分カドミウム測定に供した。菌の乾燥重量は洗浄菌体を105℃で12時間乾燥後秤量して求めた。培養液及び菌体のカドミウム量は、試料を砂浴上で有害金属分析用硝酸を用いて湿式灰化を行い、完全灰化後N/10塩酸に溶解して、島津AA-646型原子吸光光度計で測定波長228.8nmにて測定した。

#### 菌体容量の測定法

菌体容量の測定はStockらの方法<sup>10)</sup>に従い、<sup>3</sup>H] H<sub>2</sub>O および <sup>14</sup>C] Carboxyl-inulin を用

い行った。菌体懸濁液に<sup>3</sup>H] H<sub>2</sub>O および <sup>14</sup>C] Carboxyl-inulin を加え遠心分離後、上清及び沈澱の懸濁液中の<sup>3</sup>H および <sup>14</sup>C 量を、液体シンチレーションカウンターにて測定した。上清及び菌体懸濁液の放射能の割合から、<sup>3</sup>H] H<sub>2</sub>O は細胞と細胞間隙容量の和を、<sup>14</sup>C] Carboxyl-inulin は細胞間隙容量を示すものとして細胞容量を算出した。

#### 菌体各画分におけるカドミウムの分布

菌体画分におけるカドミウムの分布の測定は、カドミウム非添加液体培地にて一夜前培養した112 (Lp) を0.1mMカドミウム添加培地に201 (Lc) 及び721 (La) を1 mMカドミウム添加培地1 ℓに、各々1/100容接種して37℃、24時間静置培養した菌体を用いて行った。菌体は5,000 xg、20分間遠心分離にて集菌した。集菌菌体は100mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)で2回遠心洗浄後、ガラスビーズを加えたBüler細胞破砕器にて0℃条件下で5分間の強振を3回繰り返し破砕した。未破砕の細胞は3,000xg、10分間の遠心分離により除去した。細胞壁画分は菌体破壊液を7,000xg、20分間の遠心分離により沈澱させた。細胞質膜画分は、細胞壁を除去した上記遠心上清を144,000xg、90分間の遠心分離する事により得られる沈澱より調製し、原形質画分はその上清をもってあてた。細胞壁および原形質膜画分は各々前述の緩衝液にて再懸濁を行い測定に供した。

#### *Lactobacillus* プラスミドの調製

プラスミド調製のための菌は、後期対数増殖期まで培養後集菌したカドミウム耐性菌菌体を20mMリン酸塩緩衝液にて2回洗浄後、1 Mショ糖加20mMリン酸塩緩衝液にて懸濁し2 μg/mlのエンド-N-アセチルムラミダーゼSGを加え60℃、20分間インキュベートしてプロトプラストを形成させた。プロトプラストからのプラスミドの調製はアルカリ・ラピッド法を用いて常法に従って行った<sup>11)</sup>。

## 結 果

### 1. *Lactobacillus* および *S. aureus* の増殖に及ぼすカドミウムの影響

カドミウム存在下での供試菌株の増殖に及ぼ

すカドミウムの影響を調べた。カドミウム塩としては塩化カドミウムと硝酸カドミウムを用いたが、MIC 測定結果は両塩で全く差異を認めなかった。従って、以下の実験では取扱いの容易な塩化カドミウムを用いた。Table 2 には全供試株の各種カドミウム濃度条件での培養成績を示した。L. plantarum および L. fermentum の全供試株は、0.3mM 以上のカドミウムの存在下では全く増殖を示さなかったが、L. casei および L. acidophilus の全供試株は、1 mM 以上のカドミウムの存在下においても菌の増殖が観察された。

これら 2 グループの菌群の関係をより明確に示すために、Table 2 に示した菌の増殖の結果を MIC 値で示し比較したのが Table 3 である。Table 3 に示すごとく L. acidophilus は全株が 3 mM 以上の MIC 値を示し、高カドミウム耐性であったが、L. casei では菌株により 2 mM から 3 mM 以上のものまで存在した。L. plantarum 及び L. fermentum では MIC 値が 0.2mM また

は 0.3mM のいずれかであった。一方、対照株として用いた S. aureus は MIC 値が 0.2mM と低値を示した。MIC 値が 0.5mM から 1.0mM の間にある菌株は供試 17 株中に全く存在しなかった。従って以下の実験においては、カドミウムに対する MIC 値が 0.3mM 以下の菌群をカドミウム感受性菌として、MIC 値が 2 mM 以上の菌群をカドミウム耐性菌としてあつかった。

## 2. 菌体カドミウム含量の測定

前述のごとく、供試した 16 株の Lactobacillus は種特異的にカドミウム感受性菌と耐性菌に区別されたので、全供試菌が増殖可能であった 0.1 mM カドミウム添加液体培地で定常期まで培養後、これらの菌株におけるカドミウムの菌体含

Table 2 Effect of cadmium concentrations on growth of Lactobacillus and S. aureus.

Strains	Cadmium concentration in medium (mM)								
	0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
101 Lp	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0
111 Lp	3+	2+	1+	0	0	0	0	0	0
112 Lp	3+	3+	0	0	0	0	0	0	0
201 Lc	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+
210 Lc	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	0	0
250 Lc	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0
255 Lc	3+	3+	3+	3+	1+	1+	1+	0	0
256 Lc	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
257 Lc	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+
260 Lc	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
301 Lf	3+	2+	0	0	0	0	0	0	0
320 Lf	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0
323 Lf	3+	3+	0	0	0	0	0	0	0
701 La	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
711 La	2+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+
721 La	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
S. aureus	3+	1+	0	0	0	0	0	0	0

Growth of bacteria expressed in 3+, 2+, 1+ and 0 : 3+ : Formation of bacterial lawn, 2+ : Formation of more than 30 colonies, 1+ : Formation of 6-30 colonies, 0 : Formation of less than 5 colonies or no growth.

Table 3 Summary of MIC's to cadmium in Lactobacillus and S. aureus.

Strains	MIC (Cadmium concentration)				
	0.2mM	0.3mM	2mM	3mM	>3mM
112 Lp	101 Lp	210 Lc	250 Lc	201 Lc	
301 Lf	111 Lp	255 Lc		257 Lc	
323 Lf	320 Lf	256 Lc		260 Lc	
S. aureus				701 La	
				711 La	
				721 La	

Table 4 Relations between cadmium contents and dry cell weight in cell fraction of Lactobacillus and S. aureus grown in 0.1 mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Strains	Cd <sup>2+</sup> in cell fraction (μg)	Cell weight (mg dry wt.)	Cd <sup>2+</sup> content (μg/mg dry wt.)
101 Lp	43.2	6.8	6.35
111 Lp	7.5	5.4	1.39
112 Lp	32.2	46.0	0.70
201 Lc	26.3	12.3	2.14
210 Lc	24.0	10.0	2.40
250 Lc	83.2	17.5	4.75
255 Lc	82.3	33.5	2.46
256 Lc	58.1	26.5	2.19
257 Lc	21.2	40.8	0.52
260 Lc	8.0	2.3	3.50
301 Lf	20.1	10.4	1.93
320 Lf	16.5	7.3	2.26
323 Lf	63.7	46.8	1.36
701 La	4.3	8.4	0.51
711 La	9.0	8.1	1.11
721 La	2.9	6.7	0.43
S. aureus	87.6	3.5	25.00

量の差異について検討を加えた。

Table 4 には10mlの培養菌体中カドミウム量と菌体の乾燥重量の測定値および乾燥菌体1mg当りの菌体カドミウム量を示した。

感受性菌の菌体カドミウム含量は、101 (Lp) の6.35 $\mu$ g/mg乾燥菌体から112 (Lp) の0.70 $\mu$ g/mg乾燥菌体まで、耐性菌では250(Lc)の4.75 $\mu$ g/mg乾燥菌体から721 (La) の0.43 $\mu$ g/mg乾燥菌体までの分布を示した。一方、カドミウムに対して著しい感受性を示した *S. aureus* の菌体カドミウム量は25 $\mu$ g/mg乾燥菌体と *Lactobacillus* に比べて著しい高値を示した。Table 4 に示したmg乾燥菌体当りのカドミウム含量を、Table 3 で示した各菌体のカドミウムに対する MIC 値に対してプロットして比較したのが Fig. 1 である。カドミウム感受性菌は *L. plantarum* の1株を除いては菌体カドミウム含量は低くすべて2.26 $\mu$ g/mg乾燥菌体以下であり、耐性菌は4.75 $\mu$ g から0.43 $\mu$ g/mg乾燥菌体の間に分散していた。耐性菌の種レベルではほとんどの *L. casei* で高カドミウム含量が示され、*L. acidophilus* では低カドミ

ウム含量であった。

### 3. 菌体内外のカドミウム濃度の比較

供試菌株の細胞容量の測定を行い、培養後の菌体内カドミウム濃度を算出し、供試菌株におけるカドミウムの濃縮度を培養後の培地中カドミウム濃度と比較して求めた (Table 5)。 *Lactobacillus* の細胞容量は1mg乾燥菌体当り4.1 $\mu$ l—5.5 $\mu$ lであり、菌株間ではほとんど差を認めなかった。*S. aureus* の細胞容量は6.1 $\mu$ l/mg乾燥菌体であった。本実験で用いた菌体容量の測定では細胞壁及び細胞膜も菌体容量に加算されるので、Table 5 に示した細胞内カドミウム濃度は細胞質におけるカドミウム濃度を完全には反映していないが、カドミウムの濃縮度を知らる目安となるものと思われる。

*Lactobacillus* 16株および *S. aureus* の菌体内カドミウム濃度は、*S. aureus* の36.50mM から721 (La) の0.71mM と非常に広い範囲にわたっていた。感受性菌6株の平均は4.25mMで、耐性菌10株の平均は3.66mMで両菌群のカドミウ

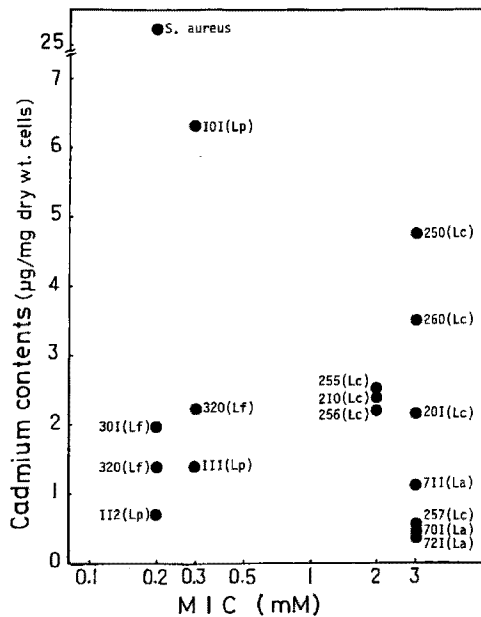


Fig. 1 Relations between MIC and cadmium ion contents in cells grown in 0.1mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Table 5 Cadmium concentrations in culture supernatant and cells and ratio of cadmium concentration in cells to cadmium concentration in culture supernatant on cultures in 0.1mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Strains	Cd <sup>2+</sup> concentration		Ratio to cells/culture sup.
	Culture sup. (mM)	Cells (mM)	
101 Lp	0.061	10.77	177
111 Lp	0.093	2.74	29
112 Lp	0.071	1.40	20
201 Lc	0.077	4.63	60
210 Lc	0.079	4.62	58
250 Lc	0.026	7.80	300
255 Lc	0.027	4.50	167
256 Lc	0.048	4.01	84
257 Lc	0.081	1.09	13
260 Lc	0.093	6.10	66
301 Lf	0.082	3.55	43
320 Lf	0.085	4.37	51
323 Lf	0.043	2.69	63
701 La	0.096	0.98	10
711 La	0.092	2.20	24
721 La	0.097	0.71	7
<i>S. aureus</i>	0.022	36.50	1,660

ム濃度には差を認めなかった。耐性菌菌種間には、*L. casei* の4.68mM と *L. acidophilus* の1.30 mM と3.6倍の差が存在したが、感受性菌菌種間にはカドミウム濃度の明確な差異を認めなかった。培養後の培地中に残ったカドミウムに対する菌体のカドミウム濃縮率は、*S. aureus* の1,660倍から721 (La) の7倍まで非常に広範囲にわたっていた。平均の濃縮率を菌種間で比較してみると *L. plantarum* で75.3倍、*L. fermentum* で52.3倍、*L. casei* で106.9倍、*L. acidophilus* で13.7倍であった。感受性菌の *L. plantarum* および *L. fermentum* のカドミウム濃縮率間には明瞭な差を認めなかったが、耐性菌2種間には約8倍の濃縮率の差を認めた。

4. 感受性菌および耐性菌におけるカドミウム流入試験

感受性菌および耐性菌における細胞外カドミウムの菌体画分への移行量の測定のため、カドミウム非添加培地にて前培養を行った菌体を集菌洗浄後0.1—1 mM カドミウム含有液体培地にて37℃、2時間インキュベートし、集菌洗浄

後の菌体画分のカドミウム量の測定を行った。供試菌株として、感受性菌でカドミウム含量の高かった101 (Lp)、カドミウム含量の低かった301 (Lf) および耐性菌でカドミウム含量の高かった201 (Lc)とカドミウム含量の低かった711 (La)を用いた。結果は Fig. 2 に示したが、いずれの菌株も高カドミウム条件でインキュベートするほど菌体内カドミウム量は増加した。しかし、感受性菌の101 (Lp) は0.1mM 条件でも高いカドミウム量を示し、カドミウム添加量の増加に応じて菌体含量も増加した。もう1株の感受性菌301 (Lf) は0.1mM では低値だったが、高カドミウム条件では101 (Lp) 以上に高いカドミウム含有量を示した。一方、耐性菌2株は共に0.7 mM カドミウムまでは菌体内カドミウム量の著しい増加が認められず、1.0mM においてカドミウム含量の増加が観察された。耐性菌2株間では Table 4 に示されたほどの明確なカドミウム含量の差が認められなかった。

5. 菌体各画分におけるカドミウム分布と細胞質カドミウム濃度

Table 4 および Fig. 1 に示したごとく、感受性菌および耐性菌の両者において菌体画分カドミウム量が菌種間で著しく異なっていたので、感受性菌の112 (Lp) および耐性菌の201 (Lc)、721 (La) における菌体各画分におけるカドミウムの分布を各菌株の増殖阻止を起こさない0.1 mM および1 mM カドミウム濃度条件にて培養後の菌体画分について調べた。0.1mM カドミウム添加培地にて培養した感受性菌112 (Lp) における菌体および各画分のカドミウム量とその百分率を Table 6 に示した。本実験における菌体

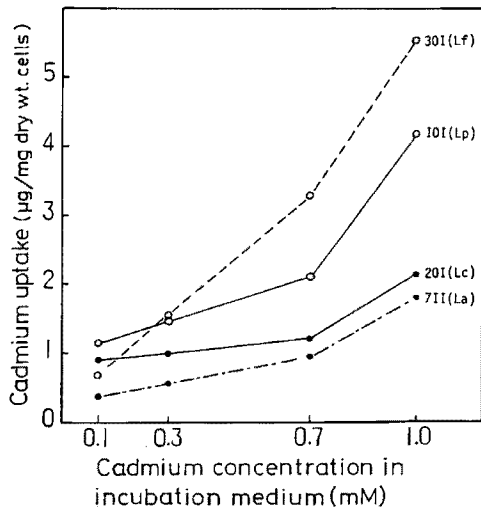


Fig. 2 Cadmium uptake experiments of cadmium sensitive and resistant *Lactobacillus*.

- , *L. plantarum* (101) ;
- , *L. fermentum* (301) ;
- , *L. casei* (201) ;
- , *L. acidophilus* (711)

Table 6 Distribution of cadmium ions in cell fractions of cadmium sensitive strain *L. plantarum* (112) grown in 0.1mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Fraction	Cd <sup>2+</sup> content (µg/g dry wt. cells)	%
Intact cells	504	100
Cell wall	67	13.2
Cell membrane	362	71.9
Cytoplasm	75	14.9

Table 7 Distribution of cadmium ions in cell fractions of cadmium resistant strain *L. casei* (201) grown in 1mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Fraction	Cd <sup>2+</sup> content (μg/g dry wt. cells)	%
Intact cells	1,543	100
Cell wall	266	17.3
Cell membrane	772	50.0
Cytoplasm	505	32.7

各画分のカドミウム量は1g乾燥菌体量に換算して比較を行った。112(Lp)では、菌体で504μgのカドミウムが認められ、その13.2%が細胞壁画分に、71.9%は細胞膜画分に認められた。細胞質画分には菌体カドミウム量の14.9%、75μgが存在したが、この量を細胞容量(4.46ml/g乾燥菌体)に基づいてカドミウム濃度として概算すると約0.15mMであった。細胞容量の計算には細胞壁および細胞膜も含まれるけれども、上述のカドミウム濃度は培地中カドミウム濃度にはほぼ匹敵していた。

1mMカドミウム添加培地で培養した耐性菌の201(Lc)および721(La)の各画分のカドミウム分布は、各々Table 7およびTable 8に示した。両者では菌体のカドミウム含量に約3倍の違いが存在し、その差は細胞膜および細胞質カドミウム量の差で示された。しかしながら、両菌種の細胞壁カドミウム量はほぼ同じであった。201(Lc)および721(La)の細胞容量は各々4.12および5.47ml/g乾燥菌体であったので、各菌体の細胞質カドミウム含量を細胞容量を用いて細胞質カドミウム濃度に換算して比較を行った。その結果201(Lc)のカドミウム濃度は1.09mMで、721(La)のそれは0.06mMであった。すなわち、201(Lc)の細胞質カドミウム濃度は培地中カドミウム濃度とほぼ同じであったが、721(La)の細胞質カドミウム濃度は0.06mMで培地中カドミウム濃度の約1/17であった。

#### 6. プラスミドの検出

現在までに明らかになっている細菌の重金属耐性遺伝子はそのほとんどがプラスミド上に存在することが明らかとなっているので、各カド

Table 8 Distribution of cadmium ions in cell fractions of cadmium resistant strain *L. acidophilus* (721) grown in 1mM CdCl<sub>2</sub> containing medium.

Fraction	Cd <sup>2+</sup> content (μg/g dry wt. cells)	%
Intact cells	482	100
Cell wall	203	42.1
Cell membrane	242	50.2
Cytoplasm	37	7.7

ミウム耐性菌のプラスミドの分析を行った。*Lactobacillus*におけるプラスミドの検出は本属菌のほとんどがリゾチーム耐性を有する事から非常に困難を伴うが、エンド-N-アセチルムラミダーゼを用いて細胞壁を消化してプロトプラストを形成後、プラスミドの調製を行った。その結果、*L. casei* 7株中210(Lc)、250(Lc)および260(Lc)にはプラスミドが確認できず、201(Lc)、255(Lc)、256(Lc)、257(Lc)には不明瞭ながらプラスミドの存在を確認した。一方、*L. acidophilus*においては、供試3株とも複数のプラスミドの存在が確認できたが、これら細菌におけるプラスミドの収量は非常に低かった。

#### 考 察

カドミウムは生体に対する毒性が良く知られた重金属であるが、細菌におけるカドミウムの毒性ならびにそれに対する耐性機構の研究はあまり多くない。我々は食品等よりカドミウムを日常的に摂取しており<sup>1)</sup>、本研究において供試した*Lactobacillus*のように腸内細菌叢を構成する細菌に対するカドミウムの影響を知ることは、ヒトの健康維持に深く関わっている腸内細菌叢の役割を考える上で重要な課題と思われる。

本研究において4種16株の*Lactobacillus*および感受性菌の対照として*S. aureus*のカドミウム含有培地での増殖を調べた結果、*Lactobacillus*はMIC値が0.3mM以下の菌群とMIC値が2mM以上の菌群に明確に大別された(Table 2, Table 3)。この結果は*S. aureus*の臨床分離株におけるカドミウム耐性菌の分布に非常に良く似ていた<sup>12)</sup>。したがって本研究における感受性菌

および耐性菌の区分も *S. aureus* に準じて行った。供試した16株の *Lactobacillus* におけるカドミウム感受性と耐性は種レベルで分かれており、*L. fermentum* と *L. plantarum* 6株は全て感受性菌であり、*L. acidophilus* と *L. casei* 10株は全て耐性菌に属していた (Table 3)。この様に同一の属に含まれる細菌が、菌種間レベルで明瞭な対カドミウム態度を異にする例は、他のいかなる細菌においても見出されておらず、*Lactobacillus* に特徴的なものと思われる。

菌体画分のカドミウム含量を比較した Table 4 と Fig. 1 および菌体画分のカドミウム濃度を比較した Table 5 の結果から、感受性菌の *L. fermentum* の菌体カドミウム量は、耐性菌の *L. casei* より低く *L. acidophilus* より高かった (危険率5%以下)。しかし感受性菌の *L. plantarum* と両耐性菌種間にはカドミウム含量に有意差を認めなかった。また、全感受性菌と全耐性菌間には明確なカドミウム含量および濃度の差は認められなかった。しかしながら、耐性菌種間の比較から *L. acidophilus* と *L. casei* の菌体カドミウム含量と濃度の両者ともに有意差 (危険率1%以下) が認められた。このことは両カドミウム耐性菌種間にはカドミウム耐性機構に違いが存在する可能性を強く示唆している。

一般に生体内に流入したカドミウムの毒性を軽減する機構としては、流入したカドミウムを高等動植物や酵母に見出されるメタロチオネンまたはそれに類似する蛋白質に結合することにより細胞質中における遊離のカドミウム濃度を低下させる機構と<sup>2),3),4)</sup>、カドミウムの流入を阻止する障壁構造<sup>7)</sup>や流入したカドミウムの汲み出しにより細胞質内カドミウム濃度の低減機構が考えられる<sup>5),6)</sup>。Fig. 2には感受性菌と耐性菌を用いたカドミウム菌体内流入試験の結果を示した。感受性菌と耐性菌間にはカドミウム取り込みの差が認められたが、2種の耐性菌間には明確な差を認めなかった。すなわち2種の耐性菌間にはカドミウムに対する障壁能にほとんど差が無いものと思われる。

2種のカドミウム耐性菌間におけるカドミウム含量の差を明らかにするために、カドミウム含有培地にて培養した菌体を分画し各画分にお

けるカドミウムの分布を感受性菌の *L. plantarum* を対照として比較を行った結果 (Table 6, 7, 8)、各菌体画分におけるカドミウム量は3株共細胞膜画分で高値を示した。これは主として細胞膜を構成するリン脂質の負荷電にカドミウムイオンが非特異的に結合したものと思われる。*L. casei* 細胞膜においてカドミウム含量が特に高かったのは、本菌における細胞質カドミウム濃度が高いために細胞膜の内外にカドミウムが結合したためと思われる。細胞壁画分中のカドミウム量は0.1mM カドミウム存在下で培養した *L. plantarum* では低値であったが、1 mM カドミウム存在下で培養した *L. acidophilus* と *L. casei* ではほぼ同一の値を示した。この結果はこれら菌株における培養条件および細胞壁構成成分とくにタイコ酸含量の差が反映されるためと考えられる。Table 4, 5で示された両耐性菌間における菌体画分カドミウム含量の差はTable 7, 8の結果より細胞膜及び細胞質におけるカドミウム含量の差を反映したものであることが明らかとなった。細胞膜へのカドミウムの結合は細胞膜を構成するリン脂質への非特異的結合と考えると、両菌種カドミウム含量の実質的な違いは細胞質カドミウム量であると思われる。

これら両菌株における細胞質カドミウム濃度を比較した結果 *L. casei* においては培地中カドミウム濃度とほぼ同一の数値が得られた。*L. casei* をカドミウム存在下にて培養した場合細胞質中にはカドミウム結合能を有する低分子量の蛋白質が存在し、この蛋白質の画分に細胞質カドミウムの90%以上が存在することを我々は認めている<sup>9)</sup>。この様な細菌におけるカドミウム結合蛋白質の存在は、カドミウム存在下で培養した *P. putida* においても認められており<sup>9)</sup>、高等動植物と同様のカドミウムの毒性低減機構が *Lactobacillus* にも存在することが明らかである。一方、*L. acidophilus* においては細胞質カドミウム含量は低く、0.1mM カドミウム存在下で培養した *L. plantarum* (Table 6) の細胞質カドミウム濃度より低値であった。2種の耐性菌間にはカドミウムに対する障壁能の差がほとんど認められなかったため、高カドミウム濃度条件下

培養しても低カドミウム濃度条件で培養した感受性菌と同一レベルの細胞質カドミウム量を示すことは、*L. acidophilus* に強力なカドミウムの細胞外への汲み出し系が存在する可能性を示唆しており、おそらく *S. aureus* において確認されているプラスミド遺伝子によるカドミウム汲み出し系<sup>5),6)</sup>と同一の機構が *L. acidophilus* にも存在するものと思われる。この様に2種の耐性菌細胞質中のカドミウム量が1 mM カドミウム条件で培養してもカドミウムの毒性発現のための高分子蛋白質への非特異的結合が感受性菌のそれと同一レベルであったことは、カドミウムの毒性が蛋白質のSH基に結合することにより発現される点から非常に興味深い。

現在までに研究された細菌における重金属耐性遺伝子は、そのほとんどがプラスミド上に存在している<sup>13),14)</sup>。本研究で用いた *L. casei* ではプラスミドを保有しない菌もあったので、カドミウム結合蛋白質は染色体遺伝子の発現により産生されると思われる。一方、*L. acidophilus* においては3株とも複数のプラスミドを保有していたが、本菌からのプラスミドの除去が非常に困難なため特定のプラスミドまたは染色体遺伝子の関与を明らかにすることはできなかった。カドミウム耐性を支配する遺伝子の同定は今後の研究の最大課題である。

*Lactobacillus* は乳製品、野菜等の食品とともにヒトに摂取されるが、これら細菌はヒト腸管への定着性をほとんど有していない。このような腸管通過細菌がカドミウム感受性および耐性菌の別なく強力なカドミウム結合能を有することは (Table 4, Table 5)、カドミウムの人体外への排出にこれら細菌が貢献している可能性が示唆される。特に、*L. casei* のようにカドミウム耐性を有し、かつ細胞質中にカドミウム結合蛋白質を有する菌株は、食品中のカドミウムを増殖に伴って大量に菌体内に蓄積する。そしてそのまま糞便と共に排泄されればカドミウム

の体外への排出を強力に行う事になり、ヒトの健康維持に貢献している可能性が大いに考えられる。

## 結 論

食品等よりヒトに摂取される頻度の高い *Lactobacillus* 4種16株の増殖に及ぼすカドミウムの影響を調べるとともに、本属菌におけるカドミウムの蓄積とカドミウム耐性機構に検討を加え以下の結果を得た。

供試菌株はMIC値が0.3mMカドミウム以下の感受性菌6株と2mMカドミウム以上の耐性菌10株の2群に分けられ、この区分は種レベルで明確に分けることが出来た。

全菌株が増殖可能な0.1mMカドミウム含有培地にて培養後の菌体画分のカドミウム含量は、感受性菌と耐性菌については明確な差を認めなかったが、耐性菌の *L. casei* と *L. acidophilus* の菌体カドミウム含量及び濃度の比較では有意差 ( $p < 0.01$ ) をもって *L. casei* が高値を示した。

菌体内へのカドミウムの流入試験で、耐性菌の2種間には差が認められなかった。

カドミウム存在条件にて培養した耐性菌における細胞質カドミウム濃度を比較した結果、*L. casei* は培地中カドミウム濃度とほぼ同じ細胞質カドミウム濃度を示し、*L. acidophilus* は培地中カドミウムの1/17と云う低値を示した。

以上の事実から、*L. casei* には細胞質にカドミウム結合蛋白質が存在し、これらにより細胞質内カドミウムの毒性を低減する機構が、*L. acidophilus* には細胞質に流入したカドミウムを菌体外に汲み出す機構が存在する可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、終始御指導並びに御校閲を賜りました恩師金政泰弘教授に深甚の謝意を表すと共に、御助言、御協力頂きました友近健一講師ならびに細菌学教室の諸先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) 鈴木継美, 鈴木庄亮: カドミウム中毒. 臨薬理 (1970) 1, 86—101.
- 2) 木村正巳: メタロチオネイン. 蛋・核・酵 (1980) 25, 738—753.



- 3) Wagner GJ : Characterization of a cadmium-binding complex of cabbage leaves. *Plant Physiol* (1984) **76**, 797—805.
- 4) Kondo N, Isobe M, Imai K and Goto T : Synthesis of metallothionein-like peptides cadystin A and B occurring in a fission yeast, and their isomers. *Agric Biol Chem* (1985) **49**, 71—83.
- 5) Tynecka Z, Gos Z and Zajac J : Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1981) **147**, 313—319.
- 6) Perry RD and Silver S : Cadmium and manganese transport of *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. *J Bacteriol* (1982) **150**, 973—976.
- 7) Silver S : Bacterial interactions with mineral cations and anions : good ions and bad ; in the Proceedings of the Fourth International Symposium on Biomineralization, Westbroek P and de Jong E eds, Reidel Publishing Company, the Netherlands (1982) pp. 11—14.
- 8) Higham DP, Sadler PJ and Scawen MD : Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* (1984) **225**, 1043—1046.
- 9) 友近健一, 片山靖夫, 田村千幸, 金政泰弘 : *Lactobacillus casei* における重金属耐性機構の解析, II. カドミウム耐性機構の解析. 乳酸菌研究会に関する報告書 (1987), 昭和61年度 pp. 279—283.
- 10) Stock JB, Rauch B and Roseman S : Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* (1977) **252**, 7850—7861.
- 11) Bimboin HC and Doly J : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* (1979) **7**, 1513—1523.
- 12) 中原英臣, 石川友章, 皿井靖長, 近藤 勇, 沢畑辰男, 伊東一広, 鶴田良子 : 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌, 大腸菌ならびに肺炎桿菌における重金属耐性菌の分布. *医のあゆみ* (1977) **100**, 517—519.
- 13) Mobley HLF and Sammers AO : Plasmid-encoded ion transport systems ; in *Ion Transport in Prokaryotes*. Rosen BP and Silver S eds, Academic Press New York (1987) pp. 305—326.
- 14) Foster TJ : Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev* (1983) **47**, 361—409.

**Analysis of cadmium resistant mechanisms of*****Lactobacillus*****Yasuo KATAYAMA****Department of Microbiology,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan****(Director : Prof. Y. Kanemasa)**

The cadmium resistance of *Lactobacillus* and its mechanism were examined, with the following results :

(1) The 16 strains of *Lactobacillus* were classified into two groups : 6 strains which were sensitive to cadmium and 10 strains which were resistant to more than 1mM cadmium.

(2) All cadmium sensitive strains belonged to *L. plantarum* and *L. fermentum* species, and all cadmium resistant strains were *L. casei* and *L. acidophilus* species.

(3) The barrier to cadmium influx in cadmium resistant strains showed no difference between *L. casei* and *L. acidophilus* strains.

(4) The cytoplasmic cadmium contents in *L. casei* were higher than those in *L. acidophilus*, and there was a significant difference between *L. casei* and *L. acidophilus* ( $P < 0.01$ ).

(5) From these results, *L. casei* appears to possess a mechanism for the detoxication of cytoplasmic cadmium using cadmium binding proteins and *L. acidophilus* appears to have a mechanism for pumping out cytoplasmic cadmium.